

B14

JP05344881A

MicroPatent Report

PRODUCTION OF L-PHENYLALANINE BY FERMENTATION METHOD

<p>[71] Applicant: AJINOMOTO CO INC</p> <p>[72] Inventors: KIKUCHI TAKASANE; FUKASE KUMIKO; SOTOUCHI NAOHITO; KURAHASHI OSAMU</p> <p>[21] Application No.: JP04154941</p> <p>[22] Filed: 19920615</p> <p>[43] Published: 19931227</p> <p><u>Go to Fulltext</u></p>	<p>[No drawing]</p>
<p>[57] Abstract:</p> <p>PURPOSE: To raise productivity of L-phenylalanine by desensitizing an enzyme to be subjected to feedback control with L- phenylalanine and culturing a transformant transduced with a gene encoding an enzyme having removed feedback inhibition.</p> <p>CONSTITUTION: A bacterium of Escherichia coli deficient in tyrR and tyrA is transformed with a DNA fragment encoding an enzyme having removed feedback inhibition substantially with L-phenylalanine by variation of one or more amino acids of DS and CM-PD and with a recombinant vector containing DNA fragment encoding SK to give a transformant. The transformant is cultured and L-phenylalanine produced in the medium is collected to produce L- phenylalanine.</p> <p>COPYRIGHT: (C)1993, JPO&Japio</p> <p>[51] Int'l Class: C12N00121 C12N01552 C12N01554 C12N01570 C12P01322 C12N00121 C12R00119 C12P01322 C12R00119</p>	



(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-344881

(43)公開日 平成5年(1993)12月27日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/21		7236-4B		
15/52				
15/54				
15/70	Z N A	8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
審査請求 未請求 請求項の数3(全 17 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願平4-154941	(71)出願人	000000066 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号
(22)出願日	平成4年(1992)6月15日	(72)発明者	菊池 慶実 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
		(72)発明者	深瀬 久美子 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
		(72)発明者	外内 尚人 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 発酵法によるL-フェニルアラニンの製造法

(57)【要約】

【目的】 L-フェニルアラニンによるフィードバック制御を受ける酵素を脱感作し、これらフィードバック阻害の解除された酵素をコードする遺伝子が導入された形質転換株を培養することにより、L-フェニルアラニンの発酵生産の生産性を高める。

【構成】 DS、CM-PDの1ないしそれ以上のアミノ酸の変異により実質的にL-フェニルアラニンによるフィードバック阻害が解除された酵素をコードするDNA断片と、そしてSKをコードするDNA断片を含む組換えベクターで、t y r R、t y r A欠失のエシエリヒア・コリ微生物を形質転換して得られる形質転換体、及び該形質転換体を培養することにより培地中に生産されたL-フェニルアラニンを取得することを特徴とする発酵法によるL-フェニルアラニンの製造法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 エシエリヒア属に属する微生物であって、宿主が tyrR、tyrA 遺伝子を欠失したものであり、かつ、フィードバック阻害が解除されたエシエリヒア属由来の3-デオキシ-D-アラビノヘプツロン酸-7-リン酸シンターゼ（以下DSと略す）であって、aroF にコードされるもののN末端より147番目のアスパラギン酸残基がアスパラギン残基に置換されたDS、aroF にコードされるもののN末端より181番目のセリン残基がフェニルアラニン残基に置換されたDS、aroG にコードされるもののN末端より150番目のプロリン残基がロイシン残基に置換されたDS、aroG にコードされるもののN末端より202番目のアラニン残基がスレオニン残基に置換されたDS、aroG にコードされるもののN末端より146番目のアスパラギン酸残基がアスパラギン残基に置換されたDS、aroG にコードされるもののN末端より147番目のメチオニン残基がイソロイシン残基に置換された332番目のグルタミン酸残基がリジン残基に置換されたDS、aroG にコードされるもののN末端より147番目のメチオニン残基がイソロイシン残基に置換されたDS、aroG にコードされるもののN末端より157番目のメチオニン残基がイソロイシン残基に置換された219番目のアラニン残基がスレオニン残基に置換されたDS、の内から選ばれるいずれか1つをコードするDNA断片と、フィードバック阻害が解除されたエシエリヒア属由来のコリスミン酸ムターゼ-プレフェン酸デヒドラターゼ（以下CM-PDと略す）であって、330番目のセリン残基がプロリン残基に置換されたCM-PD、330番目のセリン残基がアスパラギン酸残基に置換されたCM-PD、330番目のセリン残基以降が欠失したCM-PD、の内から選ばれるいずれか1つをコードするDNA断片と、シキミ酸キナーゼ（以下SKと略す）をコードするDNA断片がエシエリヒア属細菌用ベクターに挿入されて得られる組換えベクターを保持するもの。

【請求項2】 微生物がエシエリヒア・コリAJ12741である特許請求の範囲第1項記載の微生物。

【請求項3】 特許請求の範囲第1項記載の微生物を用いることを特徴とする発酵法によるL-フェニルアラニンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 L-フェニルアラニンは甘味料アスパルテームの原料として近年需要が急増しているアミノ酸である。本発明は、L-フェニルアラニンの生産に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 微生物を用いてL-フェニルアラニンを発酵生産する製造法としては、組換え体エシエリヒア・

コリを用いるものに、特開昭56-1890、特開昭57-170184、特開昭58-103398、特開昭61-92565、特開平1-104160、国際公開WO87/00202がある。またL-フェニルアラニンまたはL-チロシンの製造法としては、コリネバクテリウム属の変異株を用いるものに、特開昭61-128897があり、組換え体コリネバクテリウムを用いるものに、特開昭60-34197、特開昭60-24192、特開昭61-260892、特開昭61-124375が知られている。

【0003】 通常、L-フェニルアラニン生合成経路においては、その中心的役割を果たすキーエンザイムが最終産物により、フィードバック阻害を受ける。上記従来技術では、このフィードバック阻害の解除がなされたキーエンザイムを有する微生物を用いることにより、L-フェニルアラニンの生産を行うことを原理としている。

【0004】 従来技術において、フィードバック阻害解除の対象となるキーエンザイムとしては、3-デオキシ-D-アラビノヘプツロン酸-7-リン酸シンターゼ（以下、「DS」と略する）や、プレフェン酸デヒドラターゼ（以下、「PD」と略する）などがある。

【0005】 このうちまずDSについてであるが、エシエリヒア・コリにおいては、DSには3種類のアイソザイムが存在することが知られている。これらは、aroF、aroG、aroH と呼ばれる遺伝子にコードされ、それぞれL-チロシン、L-フェニルアラニン、L-トリプトファンによるフィードバック阻害を受ける。

【0006】 これらの遺伝子に関する塩基配列及びアミノ酸配列は、既に報告されている [aroF: Hudson, G.S. and Davidson, B.E., J. Mol. Biol., 180, 1023 (1984)/aroG: Davies, W.D. and Davidson, B.E., Nucleic Acids Res., 13, 4045 (1982)/aroH: Ray, J.M. et al, J. Bacteriol., 170, 5500 (1988)]。

【0007】 芳香族アミノ酸を効率的に生産するためには、これらDSを改良することが不可欠である。3種類のDS遺伝子のうち、aroH にコードされるDSについては、L-トリプトファンによるフィードバック阻害が解除された変異型 aroH が報告されている [Ray, J.M. et al, J. Bacteriol., 170, 5500 (1988)]。しかしながら、本来、aroH 由来のDS活性は、他のDS活性に比して非常に低いため、組換えDNA技術による改良には適さず、aroF、aroG にコードされるDSをフィードバック阻害解除したものの方がより効率的であると考えられる。

【0008】 L-チロシンによる aroF のフィードバック阻害解除変異の例としてはウェーバーとハーマンによる報告 [Weaver, L.M. and Herrmann, K.M., J. Bacteriol., 172, 6581 (1990)] があり、N末端より148番目のL-プロリン残基がL-ロイシン残基に置換している。

【0009】フィードバック阻害が解除されたDSのうち、変異部位が明示されたものが芳香族アミノ酸の発酵生産に応用された例としては、以下に示す2、3の例が知られるのみである。エドワーズらが、aroFにコードされるDSの152番目のL-グルタミン残基をL-イソロイシン残基に置換することでL-チロシンによるフィードバック阻害を解除し、L-フェニルアラニンの発酵生産に利用している〔国際公開WO87/00202〕。また、シネンキらはaroGにコードされるDSの76番目のL-ロイシン残基をL-バリン残基に置換することにより、L-フェニルアラニンによるフィードバック阻害を解除したDS (aroG) を取得してL-フェニルアラニンの発酵生産に利用している〔特開昭58-103398〕。しかしながら、本報告では、L-フェニルアラニンによるフィードバック阻害が解除されたDSの酵素活性のデータ及びL-フェニルアラニンの生産量は記載されていない。

【0010】次にPDについてであるが、エシェリヒア・コリにおいては、コリスミン酸ムターゼ（以下、「CM」と略する）およびPD活性を有する2機能酵素（CM-PD）の存在が知られ、該酵素活性はフェニルアラニンによりフィードバック阻害を受ける。尚、該酵素はpheAと呼ばれる遺伝子にコードされており、ハドソンとデビットソンにより、該遺伝子の塩基配列および該酵素のアミノ酸配列が報告されている〔Hudson, G. S. and Davidson, B. E., J. Mol. Biol., 180, 1023 (1984)〕。フェニルアラニンを効率的に生産するためには、このCM-PDのフェニルアラニンによるフィードバック阻害を解除することが肝要であり、その方法において、アミノ酸レベルで解析されたものはいくつか知られている。例えば、ゲッシングとデビットソンは、CM-PDの2個（N末端より226番目と338番目）のトリプトファン残基をジメチル〔2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルスルフォニウムブロマイド〕で修飾すると、フィードバック阻害に耐性の酵素ができることを報告している〔Gething, M. J. H. and Davidson, B. E., Eur. J. Biochem., 78, 111 (1977)〕。また、バックマンらは、CM-PDのN末端側より338番目のトリプトファン残基以降を欠失させるか、あるいはこの残基をアルギニン-グリシンに置換することによりフィードバック阻害の解除された酵素ができることを見いだしている〔特開平1-235597〕。さらに、エドワーズらは、やはり338番目のトリプトファン残基の位置にトリプトファン-アルギニン-セリン-プロリンのアミノ酸配列を挿入することにより、同様にフィードバック阻害を解除した〔国際特許WO87/00202〕。これらはすべて、338番目のトリプトファン残基について注目したものであり、その他の残基についての知見はなかった。

【0011】一方、コリネ型細菌においては、PD単独

の活性を有する酵素（PD）があり、この反応もフェニルアラニンによってフィードバック阻害を受けていることが知られている。

【0012】該酵素をコードする遺伝子のうち、尾崎ら〔Ozaki, A. et al., Agric. biol. chem., 49, 2925 (1986)〕、及び伊藤ら〔Ito, H. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 190 (1989)〕はフェニルアラニンによるフィードバック阻害が解除された遺伝子について報告している。また、フォレットとシンスキーは、天然型のPD遺伝子の塩基配列を報告しており、エシェリヒア・コリK-12のpheA遺伝子との相同性を指摘している〔Follettie, M. T. and Sinsky, A. J., J. Bacteriol., 167, 695 (1986)〕。しかしながら、コリネ型細菌においてフィードバック阻害が解除された酵素遺伝子の塩基配列に関する知見はなかった。ましてや、塩基配列レベルでの変換、それに伴うアミノ酸置換による阻害解除の試みは実施されていなかった。

【0013】L-フェニルアラニンの生合成系のもう1つのキーエンザイムにシキミ酸キナーゼ（以下、SKと略する。）があるが、エシェリヒア・コリのSK遺伝子aroLはデフェイターらによりクローニングされ〔J. Bacteriol., 165, 226 (1986)〕その塩基配列が決定されている〔J. Bacteriol., 165, 233 (1986)〕。しかしながらエシェリヒア・コリにおいてSKをL-フェニルアラニンの発酵生産に利用した具体的例はまだ報告されておらず、コリネ型細菌において報告があるのみである（特開昭62-143682）。

【0014】またエシェリヒア・コリにおいては、芳香族アミノ酸が過剰に生産されるとTy r Rというタンパク質が活性化され、芳香族アミノ酸生合成経路中の2種類のDS（遺伝子としてaroF、aroG）、SK（遺伝子としてaroL）、そしてチロシナミノトランスフェラーゼ（遺伝子としてtyrB）の遺伝子の発現を抑制する、いわゆるフィードバック抑制機構が存在することが知られている〔J. Bacteriol., 108, 400 (1971)〕。このTy r Rタンパク質の遺伝子（tyrR）が欠失したエシェリヒア・コリを用いてL-フェニルアラニンを発酵生産させている具体的な例としてはチョイとトライブラの例〔Biotechnol. Lett., 4, 223 (1982)〕、〔特開昭57-170184〕が知られている。この例ではtyrR遺伝子の欠失したエシェリヒア・コリに導入する遺伝子としてはaroFとpheAの2つだけが具体的に挙げられている。

【0015】

【本発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、L-フェニルアラニンを、効率よく発酵生産する方法を提供することである。

【0016】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、効率よくL-フェニルアラニンを発酵生産する方法を開発するこ

とを目的として研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0017】即ち本発明は、1ないしそれ以上のアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換する、あるいは欠失するなどの変異を加えることにより得られる、フィードバック阻害が解除されたDSおよびPDをコードするDNA断片、さらにSKをコードするDNA断片を含む組換えベクターで形質転換された、tyrR、tyrA遺伝子の欠失したエシェリヒア属に属する微生物、及び該微生物を培養することにより、多量のL-フェニルアラニンを生成取得することを特徴とする、L-フェニルアラニンの製造法である。

【0018】さらに本願発明は、エシェリヒア属に属する微生物であって、宿種がtyrR、tyrA遺伝子を欠失したものであり、かつ、フィードバック阻害が解除されたエシェリヒア属由来のDSであって、aroFにコードされるもののN末端より147番目のアスパラギン酸残基がアスパラギン残基に置換されたDS、aroFにコードされるもののN末端より181番目のセリン残基がフェニルアラニン残基に置換されたDS、aroGにコードされるもののN末端より150番目のプロリン残基がロイシン残基に置換されたDS、aroGにコードされるもののN末端より202番目のアラニン残基がスレオニン残基に置換されたDS、aroGにコードされるもののN末端より146番目のアスパラギン酸残基がアスパラギン残基に置換されたDS、aroGにコードされるもののN末端より147番目のメチオニン残基がイソロイシン残基に置換され332番目のグルタミン酸残基がリジン残基に置換されたDS、aroGにコードされるもののN末端より147番目のメチオニン残基がイソロイシン残基に置換されたDS、aroGにコードされるもののN末端より157番目のメチオニン残基がイソロイシン残基に置換され219番目のアラニン残基がスレオニン残基に置換されたDS、の内から選ばれるいずれか1つをコードするDNA断片と、フィードバック阻害が解除されたエシェリヒア属由来のCM-PDであって、330番目のセリン残基がプロリン残基に置換されたCM-PD、330番目のセリン残基がアスパラギン酸残基に置換されたCM-PD、330番目のセリン残基以降が欠失したCM-PD、の内から選ばれるいずれか1つをコードするDNA断片と、SKをコードするDNA断片がエシェリヒア属細菌用ベクターに挿入されて得られる組換えベクターを保持するものであり、および該微生物を用いることを特徴とする発酵法によるL-フェニルアラニンの製造法である。

【0019】本発明者らは、まずエシェリヒア・コリの天然型DS遺伝子をクローニングし、これを変異させることによりフィードバック阻害が解除されたDSをコードする新規遺伝子を取得した。また、プレバクテリウム・ラクトファーメンタムの天然型PD遺伝子をクロー

ニングし、また、L-フェニルアラニン生産菌よりフィードバック阻害が解除されたPDをコードする遺伝子を取得し、変異点を決定した。さらに、エシェリヒア・コリの天然型CM-PD遺伝子をクローニングし、プレバクテリウム・ラクトファーメンタムにおける変異点を基にこれを変異させることによりフィードバック阻害が解除されたCM-PDをコードする新規遺伝子を取得した。またSKをコードする遺伝子は通常の方法でクローニングした。

【0020】次に、DSをコードする遺伝子とPDをコードする遺伝子を組み合わせてtyrR遺伝子、tyrA遺伝子の欠失したエシェリヒア・コリに導入した時よりも、DSをコードする遺伝子とPDをコードする遺伝子、さらにはSKをコードする遺伝子を組み合わせた時の方がL-フェニルアラニンの発酵生産がよいことを見だし、本発明を完成するに至った。

【0021】以下、本発明を詳細に説明する。

【0022】本発明における、フィードバック阻害が解除されたDSをコードする新規遺伝子の取得は、以下のように行なうことができる。

【0023】先ず、エシェリヒア・コリK-12のMC1061株(ATCC53338)の染色体DNAよりPCR法を用いてaroF、aroG遺伝子をクローニングし、ヒドロキシルアミンを用いて目的の遺伝子を変異させた。

【0024】aroF及びaroGとは、L-チロシン、L-フェニルアラニンでそれぞれフィードバック阻害を受けるDSをコードする遺伝子をいい、遺伝的多系統などによる変異型も含む。尚、遺伝的多系統とは、遺伝子上の自然突然変異により蛋白質のアミノ酸配列が一部変化している現象をいう。

【0025】遺伝子に変異を生じさせるには、リコンビナントPCR法[PCR Technology, Stockton press (1989)]、部位特異的変異法[Kramer, W. and Frits, H. J., Methods in Enzymology, 154, 350 (1987)]や当該遺伝子を保有する菌株を紫外線照射する方法もしくは化学薬剤処理(N-メチル-N'-ニトロソグアニジン、亜硝酸など)する方法、更に目的遺伝子を化学合成する方法がある。

【0026】DSにおいて、他のアミノ酸に置換されるアミノ酸残基とは、L-チロシン、L-フェニルアラニン、あるいはL-トリプトファンによるフィードバック阻害のメカニズムに関わるアミノ酸配列領域に存在するアミノ酸残基をいう。例えばaroFによってコードされるDSでは、N末端側より147番目のアスパラギン酸残基、181番目のセリン残基をいい、これらは表1にまとめられている。

【0027】DSにおける他のアミノ酸残基への置換とは、L-チロシン、L-フェニルアラニン、あるいはL-トリプトファンによるフィードバック阻害が解除され

るような他のアミノ酸残基への置換をいい、表1にまとめた通りである。

【0028】

【表1】

アミノ酸置換部位			
変異遺伝子			対応塩基配列
N末端よりの位置		アミノ酸配列	
aroF15	147番目	Asp→Asn	GAT→AAT
aroF33	181番目	Ser→Phe	TCC→TTC
aroG4	150番目	Pro→Leu	CCA→CTA
aroG8	202番目	Ala→Thr	GCC→ACC
aroG15	146番目	Asp→Asn	GAT→AAT
aroG17	147番目	Met→Ile	ATG→ATA
	332番目	Glu→Lys	GAA→AAA
aroG29	147番目	Met→Ile	ATG→ATA
aroG40	157番目	Met→Ile	ATG→ATA
	219番目	Ala→Thr	GCG→ACG

【0029】本発明における、フィードバック阻害が解除されたPD、即ちブレバクテリウム・ラクトフェルメンタムにおいてはPD、エシェリヒア・コリにおいてはCM-PDをコードする新規遺伝子の取得は、以下のように行った。

【0030】まず、L-フェニルアラニンを良好に生産するブレバクテリウム・ラクトフェルメンタムの、L-フェニルアラニンによるフィードバック阻害が解除されたPD遺伝子の塩基配列を決定、解析することにより、生産株では野生株と比べて1アミノ酸が置換していることを見いだした。次に、本知見に基づきエシェリヒア・コリK-12におけるCM-PDの相同領域に同じアミノ酸置換、すなわち、330番目のセリン残基をプロリン残基に置換したところ、フィードバック阻害の解除したCM-PDを取得することができた。あるいは該330番目のセリン残基をアスパラギン酸残基に置換したCM-PDおよび該330番目のセリン残基以降が欠失したCM-PDを造成したところ、該酵素がフィードバック阻害解除されていることが判明した。

【0031】本発明でいうPD活性を有する酵素とは、コリネ型細菌などの微生物由来で単独の該活性を有するもの、さらにエシェリヒア・コリなどの微生物由来でCM-PDといった2機能の活性を有するものをいう。

【0032】PDにおいて、他のアミノ酸に置換される、あるいは欠失されるアミノ酸残基とは、L-フェニルアラニンによるフィードバック阻害のメカニズムに関わるアミノ酸配列領域に存在するアミノ酸残基をいう。例えば、ブレバクテリウム・ラクトフェルメンタムのPDにおいてはN末端側より235番目、エシェリヒア・コリのCM-PDにおいてはN末端側より330番目のセリン残基の置換であり、また、エシェリヒア・コリのCM-PDのN末端側より330番目のセリン残基以降の欠失をいう。

【0033】PDにおいて、他のアミノ酸残基への置換とは、L-フェニルアラニンによるフィードバック阻害が解除されるような他のアミノ酸への置換をいい、たとえばブレバクテリウム・ラクトフェルメンタムのPDにおいてはN末端側より235番目、エシェリヒア・コリのCM-PDにおいてはN末端側より330番目のセリン残基のプロリン残基への置換をさす。さらにはエシェリヒア・コリK-12の該330番目のセリン残基をアスパラギン酸残基に置換したものをいう。

【0034】SK遺伝子についてはエシェリヒア・コリK-12のMC1061株の染色体DNAよりPCR法を用いてaroL遺伝子をクローニングした。クローニングの方法についてはPCR以外の、従来より行われて

いるエシェリヒア・コリの遺伝子ライブラリーより取得する方法でもよい。

【0035】以上の方法で取得される組換えDNAとは、フィードバック阻害を解除したDS、PDそしてSKをコードする有用遺伝子をパッセンジャーとして、プラスミドやファージDNAのベクターに組み込んだものをいう。その際、該有用遺伝子の発現を効率的に実施するために、lac、trp、PL等のエシェリヒア・コリで働くプロモーターを用いてもよい。尚、ここでいう組換えDNAには、該有用遺伝子をトランスポゾン [Berg, D.E. and Berg, C.M., Bio/Technol., 1, 417 (1983)]、Muファージ [特開平2-109985] または相同性組換え [Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972)] を用いた方法で染色体に組み込んだものも含まれる。

【0036】tyrR遺伝子の欠失したエシェリヒア・コリの取得は、先ずtyrR遺伝子のクローニングより行った。エシェリヒア・コリK-12のMC1061株の染色体DNAよりPCR法を用いてtyrR遺伝子をクローニングした。このtyrR遺伝子を適当な制限酵素で処理することにより欠失tyrR遺伝子を構築し、この欠失tyrR遺伝子をエシェリヒア・コリの染色体上の正常なtyrRと入れ換えること、つまり相同性組換えを利用した遺伝子置換の手法によりtyrRの欠失したエシェリヒア・コリを造成した。尚、欠失tyrR遺伝子の構築には制限酵素処理で欠失させる他、先に述べたような化学薬剤処理やリコンビナントPCR法、部位特異的変異法、更に欠失tyrR遺伝子を化学合成する方法が考えられる。またエシェリヒア・コリを紫外線照射する方法もしくは化学薬剤処理（N-メチル-N'-ニトロソグアニジン、亜硝酸など）する方法などにより、tyrR遺伝子の欠失したエシェリヒア・コリを直接造成することもできる。

【0037】tyrA遺伝子の欠失したエシェリヒア・コリの取得もtyrRの場合と同様に達成される。tyrA遺伝子はプレフェン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である。該酵素はプレフェン酸からL-チロシンを合成する経路の反応を触媒するものであり、これを欠損した株ではプレフェン酸がL-フェニルアラニンへと効率よく変換される。

【0038】以上の方法で取得した、フィードバック阻害が解除されたDSおよびPD遺伝子、そしてSK遺伝子を含む組換えDNAで形質転換されたtyrR、tyrA遺伝子が欠失したエシェリヒア・コリを培養し、培養液にL-フェニルアラニンを生成蓄積せしめ、これを採取した。

【0039】使用するL-フェニルアラニン生産用の培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地である。

【0040】炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースやでんぷんの加水分解物などの糖類、グリセロールやソルビトールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。

【0041】窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

【0042】有機微量栄養源としては、ビタミンB1、L-チロシンなどの要求物質または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。

【0043】これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。

【0044】培養は好気的条件下で16~72時間実施するのがよく、培養温度は30℃~45℃に、培養中pHは5~7に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

【0045】発酵液からのL-フェニルアラニンの採取は通常イオン交換樹脂法、沈澱法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

【0046】以上に述べた方法により、フィードバック阻害が解除されたDSおよびPD、そしてSKを有するtyrR、tyrA遺伝子の欠失したエシェリヒア・コリ形質転換株を培養すると、L-フェニルアラニン生産性について大幅な向上がみられた。このことは本発明の有用性を実証したものである。

【0047】以下、実施例に基づき更に具体的に説明する。

【0048】

【実施例】

実施例1 フィードバック阻害が解除されたDSをコードする新規遺伝子の取得

(1) エシェリヒア・コリのaroF由来変異型DS遺伝子の取得

エシェリヒア・コリK-12のMC1061株から、通常の方法に従って染色体DNAを抽出した。一方、公知の文献 [J. Mol. Biol., 180, 1023 (1984)] に記載されているaroF遺伝子の塩基配列に基づいて配列番号1及び2に示すような合成DNAプライマー2本を通常の方法で合成した。

配列番号1 GCTAACCACT AAAGCCAACA

配列番号2 CCCACTTCAG CAACCACTTC

これらはそれぞれaroF遺伝子の上流及び下流に相対的な配列を有する。この染色体DNAとDNAプライマーを用いてエルリッチらの方法 [PCR Technology, Stockton press (1989)] に従ってPCR反応を行ない、1.5 KbpのDNA断片を得た。以下、図1の左側に示すように、この断片を制限酵素EcoRVとEco47II

Iで切断した後、pHSG398（宝酒造社製）のSma I切断物をT4DNAリガーゼを用いて連結した。この反応混合物でエシェリヒア・コリK-12のJM109株（宝酒造社製）を形質転換し、生育したクロラムフェニコール耐性株の中でaroF遺伝子が挿入されたプラスミドを保有する菌株からプラスミドを抽出し、プラスミドpHSG-aroFを取得した。更にpHSG-aroFを制限酵素EcoRIとHindIIIで切断することにより得たaroF遺伝子含有DNA断片を、T4DNAリガーゼでプラスミドpTS1（特願平2-192162）のEcoRI、HindIII切断フラグメントと連結した。この反応混合物でエシェリヒア・コリK-12のDS欠損（aroF、aroG、aroH）株AB3257を形質転換した（AB3257株は、エシェリヒア・コリ ジェネティック ストック センターより入手した）。生育したアンピシリン耐性株の中でL-チロシン、L-フェニルアラニン、L-トリプトファンの要求性が消失した株からプラスミドを抽出し、プラスミドpTS-aroFを取得した。

【0049】次に、プラスミドpTS-aroFをヒドロキシルアミンを用いた方法[J. Mol. Biol., 175, 331 (1984)]によって変異処理を行なった後、AB3257株に形質転換し、アンピシリン耐性株を取得後、1mMのL-チロシン添加の最少培地に生育した株を2株選択し、これらの菌株よりフィードバック阻害が解除されたaroF遺伝子含有するプラスミドpTS-aroF15及びpTS-aroF33を得た。フィードバック阻害が解除されていないaroFを含むプラスミドを保有するAB3257株は、図2に示す通り最少培地に1mMのL-チロシンを加えると、該DS活性がフィードバック阻害を受け、L-フェニルアラニンやL-トリプトファンといった芳香族アミノ酸を合成できず、生育することができなくなる。

【0050】（2）エシェリヒア・コリのaroG由来変異型DS遺伝子の取得

aroF遺伝子の場合と同様にして、変異型aroG遺伝子を取得した。公知の文献[Nucleic Acids Res., 10, 4045 (1982)]に記載されているaroG遺伝子の塩基配列に基づいて配列番号3及び4に示すような合成DNAプライマー2本を合成した。

配列番号3 GTATTACCC CGTTATTGTC

配列番号4 ACTCCGCGG AAGTGACTAA

該プライマーとMC1061株の染色体DNAを用いて、PCR反応を行ない、2.1kbpのDNA断片を得た。以下、図1の右側に示すように、この断片を制限酵素SalIとEco47IIIで切断した後、pHSG398（宝酒造社製）のSalIとSmaI切断物をT4DNAリガーゼを用いて連結した。この反応混合物でJM109株を形質転換し、生育したクロラムフェニコール耐性株の中でaroG遺伝子が挿入されたプラス

ミドを保有する菌株からプラスミドを抽出し、プラスミドpHSG-aroGを取得した。さらにpHSG-aroGを制限酵素EcoRIとHindIIIで切断することにより得られたaroGを含有するDNA断片を、T4DNAリガーゼで、pTS1のEcoRI、HindIII切断フラグメントと連結した。この反応混合物でAB3257株（aroF、aroG、aroH）を形質転換し、生育したアンピシリン耐性株の中でL-チロシン、L-フェニルアラニン、L-トリプトファンの要求性が消失している株からプラスミドを抽出し、プラスミドpTS-aroGを取得した。

【0051】次に、このプラスミドをaroFの場合と同様にヒドロキシルアミンによる変異処理を行なった後、AB3257株に形質転換し、アンピシリン耐性株を取得した。これらの菌株から10mMのL-フェニルアラニン添加の最少培地に生育した菌株を6株選択し、これらの菌株よりフィードバック阻害が解除されたaroG遺伝子含有するプラスミドpTS-aroG4、pTS-aroG8、pTS-aroG15、pTS-aroG17、pTS-aroG29、pTS-aroG40を得た。フィードバック阻害が解除されていないaroGを含むプラスミドを保有するAB3257株は、図3に示す通り最少培地に10mMのL-フェニルアラニンを添加すると、該DS活性がフィードバック阻害を受け、L-トリプトファンやL-チロシンといった芳香族アミノ酸を合成できず、生育することができなくなる。

【0052】（3）DS酵素活性の測定

上述の変異型aroF（2種類）及び変異型aroG（6種類）を含有するプラスミドを、DS活性を有しないエシェリヒア・コリAB3257株に導入して形質転換株を取得し、それぞれをAJ12598（AB3257/pTS-aroF15）、AJ12599（AB3257/pTS-aroF33）、AJ12562（AB3257/pTS-aroG4）、AJ12600（AB3257/pTS-aroG8）、AJ12563（AB3257/pTS-aroG15）、AJ12601（AB3257/pTS-aroG17）、AJ12602（AB3257/pTS-aroG29）及びAJ12603（AB3257/pTS-aroG40）と命名した。これらの内、代表株としてAJ12563、AJ12603をそれぞれ、エシェリヒア・コリ FERM BP-3567、FERM BP-3568として微工研に寄託した。尚、比較のため、天然型の遺伝子を含有するプラスミドも同様に導入した。

【0053】これらの菌株を既知のL-フェニルアラニン生産培地[Sugimoto, S. et al., J. Biotechnol., 5, 237 (1989)]を用いて24時間培養した。この培養菌体より超音波破碎によって粗酵素液を調製し、通常の方法[Gollub, E. et al., Methods Enzymol., 17, 349]

に従って、aroFの場合はL-チロシン存在下で、aroGの場合はL-フェニルアラニン存在下でDSの酵素活性を測定した。その結果、図2と図3に示すように、天然型のもの（エシェリヒア・コリAB3257/pTS-aroF）ではL-チロシンの存在下で酵素活性が強く阻害されているのに対し、それぞれの変異型のものではL-チロシンによるフィードバック阻害が解除されていた。同様に、もう一方の天然型のもの（エシェリヒア・コリAB3257/pTS-aroG）では、L-フェニルアラニンの存在下で酵素活性が強く阻害されるのに対し、それぞれの変異型のものではL-フェニルアラニンによるフィードバック阻害が解除されていた。さらに変異型のうちAJ12562株のDSは、L-フェニルアラニンによるフィードバック阻害が解除されているだけではなく、L-フェニルアラニンの濃度に従って、酵素活性が上昇した。

【0054】(4) フィードバック阻害が解除されたDSの変異点の決定

フィードバック阻害が解除されたDSの遺伝子であるaroF15、aroF33、aroG4、aroG8、aroG15、aroG17、aroG29、aroG40の塩基配列を通常の方法[Molecular Cloning (Second Edition), Cold Spring Harbor Press (1989)]に従って決定した。具体的なアミノ酸配列上の置換部位及びその対応塩基配列上の変異点を表1に示す。これらの配列はすべて、これまでに報告のないものであった。

【0055】実施例2 フィードバック阻害が解除されたPDをコードする新規遺伝子の取得

(1) プレバクテリウム変異型PDの変異点の決定
まず、既知のコリネバクテリウムのPD遺伝子[Follett, M.T. and Sinsky, A.J., J. Bacteriol., 167, 695 (1986)]との相同性を指標として、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム野生株のPD遺伝子を含むプラスミドpAJ116中のNcoI断片の塩基配列をダイデオキシ法により決定した。配列を配列表の配列番号5に示す。尚、該プラスミドは、プレバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ12125 (FERM-P7546)に保持される。尚、該アミノ酸配列はコリネバクテリウムのものと比べて、わずか1アミノ酸残基異なっていた。次に、同じくプラスミドpPH14上にあるプレバクテリウム・ラクトファーメンタムのフェニルアラニン生産株のPDをコードする遺伝子の塩基配列を決定したところ、配列表の配列番号6に示すような配列が得られた。尚、該プラスミドはプレバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ12259 (FERM-P-3565)株に保有されるものを使用した。野生株とフィードバック阻害解除がなされた株と比較したところ235番目のセリン残基がプロリン残基に変異していた。

【0056】(2) エシェリヒア・コリの変異型CM-PDをコードする新規遺伝子の構築

まず、エシェリヒア・コリK-12のRR1株から、通常の方法に従って、染色体DNAを抽出した。

【0057】一方、公知の文献[Hudson, G.S. and Davidson, B.E., J. Mol. Biol., 180, 1023 (1984)]に記載されているpheA遺伝子の塩基配列に基づいて、以下に示すような合成DNAプライマー4本（配列番号7-10）を通常の方法で化学合成した。

配列番号7 TCAACAAGCT GGAACGGACG

配列番号8 CGCCGATTTA CCGCCTTGAG

配列番号9 CCGTCTGGAA CCACGCCCGA T

配列番号10 ATCGGGCGTG ATTCCAGACG G

7と8はそれぞれpheA遺伝子の上流および下流に相同な配列を持つ。9と10はたがいに相補的であり、T（チミン塩基）がC（シトシン塩基）に置換した1塩基のみ異なる以外、330番目のセリン残基近傍の配列と相同性を持つ。エシェリヒア・コリK-12のCM-PDとプレバクテリウム・ラクトファーメンタムのPDとは高い相同性を有し、特にエシェリヒア・コリK-12のCM-PDのN末端より330番目のセリン残基は、プレバクテリウム・ラクトファーメンタムPDのN末端より235番目のセリン残基に相当するものである。該配列番号9、10は、330番目のセリン残基がプロリン残基となるよう合成されている。

【0058】次に、染色体DNA 1μgと、配列番号7および10のプライマーのおおの300ng、または配列番号8および9のプライマーのおおの300ngを用いて、PCR反応を行い、それぞれ1.3Kbpと0.5KbpのDNA断片を得た。該PCRの方法は、エルリッヒらの方法[Erlich, H.A., ed., PCR Technology, Stockton press (1989)]にしたがって、連続複製反応装置(Thermal cycler, Perkin Elmer Cetus社製)を用いて94℃1分間、50℃2分間、72℃3分間の反応を1サイクルとして20サイクル行なった。これらのDNA断片をアガロースゲル電気泳動し、DNA回収キット(Gene Clean, フナコシ社製)をもちいて回収し、更にこれらの断片と配列番号7と8のプライマーを用いてPCR反応を行い、1.8KbpのDNA断片を得た。この断片を制限酵素BamHIとPstIで切断した後、1.7KbpのDNA断片をアガロースゲル電気泳動により回収し、更にこの断片とプラスミドpHSG398(宝酒造社製)のBamHI、PstI切断物をT4リガーゼを用いて連結した。これをエシェリヒア・コリK-12のKA197株(pheA)に形質転換し、クロラムフェニコール耐性株の中で、フェニルアラニン要求性が消失している株からプラスミドを回収し、pPHABと命名した。塩基配列を決定することにより該プラスミドが、330番目のセリン残基がプロリン残基に置換した変異型CM-PD酵素遺伝子を保有することを確認した。

【0059】(3) エシェリヒア・コリK-12のty

rA遺伝子欠損性W3110株の造成

まず、エシェリヒア・コリK-12のW3110株（国立遺伝研究所より入手）をストレプトマイシンを含む平板培地に塗布することにより、ストレプトマイシン耐性株を取得した。次に、この株とエシェリヒア・コリK-12のME8424株（HfrPO45、thi、relA1、tyrA::Tn10、ung-1、nadB）（国立遺伝研究所より入手）の培養液を混合し、37℃で15分間放置して接合伝達を行わせた後、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、L-チロシンを含む平板培地に塗布し、生じたコロニー即ちエシェリヒア・コリK-12のW3110（tyrA）株を取得した。この株に、（2）で得たプラスミドpPHABを形質転換により導入した。尚、エシェリヒア・コリK-12の該形質転換株[W3110（tyrA）/pPHAB]は微工研に寄託されており、寄託番号はFERM BP-3566である。

【0060】（4）PD酵素活性の測定

エシェリヒア・コリK-12のW3110（tyrA）/（pPHAB）株の菌体を、L培地を用いて37℃、15時間培養した培養液を遠心分離することにより集菌した。次いで、該菌体を生理食塩水にて2回洗浄し、氷冷下0.5mMジチオスレイトールを含む250mMのトリス塩酸緩衝液（pH7.5）に懸濁した後、30秒間、4回の超音波（20kHz）破碎することにより粗酵素液を調製した。

【0061】PD酵素活性測定は、常法[Cotton, R.G. H. and Gibson, F., Meth. in Enzymol., 17, 564 (1970)]に従った。すなわち、粗酵素液を用いて、1mMブフェン酸バリウムおよび0.5mMチロシンを含む50mMトリス塩酸緩衝液（pH8.2）存在下、37℃10分反応させ、1N水酸化ナトリウムを加えて反応を停止後、生成したフェニルピリビン酸を320nmの吸光波長にて測定した。蛋白定量法はプロテイン アッセイキット（Bio Rad社製）を用い、そのプロトコールに従った。結果は第4図に示すように、野生型CM-PDでは0.5mM L-フェニルアラニン存在下で強く酵素反応が阻害されるのに対し、変異型CM-PDは5mM L-フェニルアラニンでもほとんど阻害を受けなかった。

【0062】さらにL-フェニルアラニンの非存在下での野生型酵素遺伝子を保有するプラスミドの場合は、 3.5×10^2 U/mg蛋白で、変異型の場合は 1.5×10^4 U/mg蛋白と、より高い酵素活性を示した。このことにより、当該変異を導入することにより、L-フェニルアラニンによるフィードバック阻害解除のみならず、酵素量または酵素活性が40倍増大させることができた。

【0063】（5）エシェリヒア・コリの変異型CM-PDをコードする新規遺伝子の構築

また（2）同様に、配列番号11-14の合成DNAを作製し、これを用いて330番目のセリン残基がアスパラギン酸残基に置換したCM-PDおよび330番目のセリン残基以降が欠失したCM-PDをコードする遺伝子を構築した。これらの遺伝子を含有するプラスミドはそれぞれpPHAD、pPHATermと命名した。

配列番号 11 CCGTCTGGAA GACCGC
CCGA T

配列番号 12 ATCGGGCGGT CTTCCA
GACG G

配列番号 13 CCGTCTGGAA TGACGCCGA T

配列番号 14 ATCGGGCGTC ATCCAGCG G

【0064】更に、このプラスミドをW3110（tyrA）株に通常の形質転換法を用いて導入した。なお、W3110（tyrA）/pPHAD、W3110（tyrA）/pPHATermはそれぞれ微工研に寄託されており、寄託番号はそれぞれFERM BP-3652とFERM BP-3653である。

【0065】（6）PD酵素活性の測定

エシェリヒア・コリK-12のW3110（tyrA）/pPHAD株、W3110（tyrA）/pPHATerm株の菌体を、L培地を用いて37℃、15時間培養した培養液を遠心分離することにより集菌した。次いで（4）と同様に、PD酵素活性の測定を行った。結果は（4）と同様であり、変異型CM-PDは5mM L-フェニルアラニンでもほとんど阻害を受けなかった。

【0066】さらに、L-フェニルアラニンの非存在下でのこれら2種の変異型酵素の活性は 1.5×10^4 U/mg蛋白であった。このことにより、当該変異を導入することによっても、L-フェニルアラニンによるフィードバック阻害解除のみならず、酵素量または酵素活性が40倍増大させることができた。

【0067】実施例3 SK遺伝子の取得

まず、エシェリヒア・コリK-12のMC1061株から、通常の方法に従って、染色体DNAを抽出した。

【0068】一方、公知の文献[J. Bacteriol., 165, 233 (1986)]に記載されているaroL遺伝子の塩基配列に基づいて、以下に示すような合成DNAプライマー2本（配列番号15-16）を通常の方法で化学合成した。

配列番号15 GCGGAGCTCG AGAAGTGGTG

配列番号16 ACTCAGAATT CCTTCCGAGC

15と16はそれぞれaroL遺伝子の上流及び下流にほぼ相同な配列を有する。この染色体DNAとDNAプライマーを用いてエルリッチらの方法[PCR Technology, Stockton press (1989)]に従ってPCR反応を行ない、1.0KbpのDNA断片を得た。以下、図5に示すように、この断片を制限酵素EcoRIとSacIで切断した後、pHSG398（宝酒造社製）のEcoR

IとSacI切断物をT4DNAリガーゼを用いて連結してpHSG-aroLを得た。

【0069】実施例4 tyrR、tyrA遺伝子が欠失したエシェリヒア・コリK-12のW3110株の造成

エシェリヒア・コリK-12のMC1061株から、通常の方法に従って染色体DNAを抽出した。一方、公知の文献[J. Biol. Chem., 261, 403 (1986)]に記載されているtyrR遺伝子の塩基配列に基づいて配列番号17及び18に示すような合成DNAプライマー2本を通常の方法で合成した。

配列番号17 GGATTAAAGC TTGGAGCTT

配列番号18 GTGGATGAAT TCACCACCGA

これらはそれぞれtyrR遺伝子の上流及び下流にほぼ相同な配列を有する。この染色体DNAとDNAプライマーを用いてエルリッヒらの方法[PCR Technology, Stockton press (1989)]に従ってPCR反応を行ない、1.9KbpのDNA断片を得た。この断片を制限酵素EcoRIとHindIIIで切断した後、pTS1のEcoRIとHindIIIの切断物とT4DNAリガーゼを用いて連結しpTS-tyrRを得た。

【0070】次にpTS-tyrRを制限酵素BglIIで切断しtyrR遺伝子内の約300bpの断片を欠失させ、残りの断片をDNAブランディングキット(宝酒造社製)で平滑末端化した後、再び環状化させpTS- Δ tyrRを構築した。構築したpTS- Δ tyrRをエシェリヒア・コリK-12のW3110株(国立遺伝研究所より入手)に導入して、相同性組換えを起こして染色体上の正常なtyrR遺伝子と、導入した Δ tyrR遺伝子が置換した株を3-フルオロチロシン耐性により選択し、tyrR遺伝子が欠失したエシェリヒア・コリK-12のW3110株を造成した。

【0071】次に、造成したtyrR遺伝子の欠失したエシェリヒア・コリK-12のW3110株をストレプトマイシンを含む平板培地に塗布することにより、ストレプトマイシン耐性株を取得した。次に、この株とエシェリヒア・コリK-12のME8424株(HfrPO45, thi, relA1, tyrA:Tn10, ung-1, nadB) (国立遺伝研究所より入手)の培養液を混合し、37℃で15分間放置して接合伝達を行なった後、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、L-チロシンを含む平板培地に塗布し、生じたコロニー即ちtyrR、tyrA遺伝子の欠失したエシェリヒア・コリK-12のW3110株を取得した。

【0072】実施例5 L-フェニルアラニンの発酵生産

(1) フィードバック阻害が解除されたDSおよびCM-PD、そしてSKを保有するtyrR、tyrA遺伝子の欠失したエシェリヒア・コリK-12のW3110株の造成

実施例1で得られた、フィードバック阻害が解除されたDS遺伝子を含有するpTS-aroG4を制限酵素EcoRIとHindIIIでaroG4部分を切り出し、この断片をpBR322のEcoRI、HindIII切断部位に挿入してプラスミドpBR-aroG4(アンピシリン耐性マーカー)を取得した。また、実施例2で得られたフィードバック阻害が解除されたCM-PD遺伝子を含有するpPHABを、制限酵素BamHIとHindIIIで消化しCM-PD遺伝子含有フラグメントを切り出し、この断片をpBR-aroG4のBamHI、HindIII切断部位に挿入してプラスミドpBGA1を構築した。さらにpBGA1をEcoRIとBamHIで消化してaroG4-pheA断片を切り出し、この断片をpMW19(和光純薬社製)のEcoRI、BamHI切断部位に挿入してプラスミドpMGA1を構築した。

【0073】さらにpHSG-aroLをEcoRIとSacIでaroL断片を切り出し、この断片をpMGA1のEcoRI、SacI切断部位に挿入してプラスミドpMGAL1を構築した。

【0074】次にpMGA1またはpMGAL1をtyrR、tyrA遺伝子の欠失したエシェリヒア・コリK-12のW3110株にそれぞれ導入し、形質転換株W3110(tyrR、tyrA)/pMGA1および形質転換株W3110(tyrR、tyrA)/pMGAL1を造成した。該形質転換株はそれぞれAJ12740株、AJ12741株と命名し、微工研に寄託(FERM P-12999、FERM P-13000)した。

【0075】(2) L-フェニルアラニン生産性

前項で記載した形質転換株AJ12604をL-フェニルアラニン生産用培地(グルコース20g、リン酸水素2ナトリウム29.4g、リン酸2水素カリウム6g、塩化ナトリウム1g、塩化アンモニウム2g、クエン酸ナトリウム10g、グルタミン酸ナトリウム0.4g、硫酸マグネシウム7水和物3g、塩化カルシウム0.23g、サイアミン塩酸塩2mg、チロシン75mgを水1Lに含む)を用いて、37℃で24時間培養した。その結果を表2に示す。尚、定量は高速液体クロマトグラフィーで実施した。

【0076】

【表2】

Ｌ－フェニルアラニン

菌 株

蓄 積 量

(g / L)

A J 1 2 7 4 0

4 . 0 5

A J 1 2 7 4 1

4 . 3 1

【 0 0 7 7 】

【発明の効果】 Ｌ－フェニルアラニンの発酵生産において、効率のよい新規生産菌及び該菌株を用いるＬ－フェニルアラニンの製造法を提供する。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCTAACCAGT AAAGCCAACA 20

配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCCCTTCAG CAACCAGTTC 20

配列番号：3

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

ATG AGC GAC GCA CCA ATT GTT GTG GCC TAT TTG GGG CCT GCC GGA ACC 48

Met Ser Asp Ala Pro Ile Val Val Ala Tyr Leu Gly Pro Ala Gly Thr

1

5

10

15

TTC ACC GAA GAA GCC CTC TAC AAA TTT GCC GAC GCC GGC GTA TTC GGC 96

Phe Thr Glu Glu Ala Leu Tyr Lys Phe Ala Asp Ala Gly Val Phe Gly

20

25

30

GAC GGT GAG ATC GAG CAG CTA CCA GCC AAA TCG CCA CAA GAA GCT GTC 144

Asp Gly Glu Ile Glu Gln Leu Pro Ala Lys Ser Pro Gln Glu Ala Val

35

40

45

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTATTACCC CGTTATTGTC 20

配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACTCCGCCGG AAGTGAATAA 20

配列番号：5

配列の長さ：948

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム(Brevibacterium lactofermentum)

株名：AJ12125(FERM P-7546)

GAC GCG GTC CGC CAC GGC ACC GCC CAG TTC GCG GTG GTC GCC ATC GAA	192
Asp Ala Val Arg His Gly Thr Ala Gln Phe Ala Val Val Ala Ile Glu	
50 55 60	
AAC TTC GTC GAC GGC CCC GTC ACC CCC ACC TTC GAC GCC CTT GAC CAG	240
Asn Phe Val Asp Gly Pro Val Thr Pro Thr Phe Asp Ala Leu Asp Gln	
65 70 75 80	
GGC TCC AAC GTG CAA ATC ATC GCC GAA GAA GAA CTC GAT ATT GCC TTT	288
Gly Ser Asn Val Gln Ile Ile Ala Glu Glu Glu Leu Asp Ile Ala Phe	
85 90 95	
TCC ATC ATG GTC CGG CCA GGG ACT TCG CTT GCC GAC GTC AAA ACC CTC	336
Ser Ile Met Val Arg Pro Gly Thr Ser Leu Ala Asp Val Lys Thr Leu	
100 105 110	
GCC ACC CAC CCG GTT GGG TAC CAA CAA GTG AAA AAC TGG ATG GCA ACC	384
Ala Thr His Pro Val Gly Tyr Gln Gln Val Lys Asn Trp Met Ala Thr	
115 120 125	
ACC ATT CCG GAC GCC ATG TAT CTT TCA GCA AGC TCC AAC GGC GCC GGC	432
Thr Ile Pro Asp Ala Met Tyr Leu Ser Ala Ser Ser Asn Gly Ala Gly	
130 135 140	
GCA CAA ATG GTT GGC GAA GGA ACC GCC GAC GCA GCC GCA GCG CCC TCC	480
Ala Gln Met Val Ala Glu Gly Thr Ala Asp Ala Ala Ala Pro Ser	
145 150 155 160	
CGC GCA GCC GAA CTC TTC GGA CTG GAA CGC CTT GTT GAT GAT GTC GCC	528
Arg Ala Ala Glu Leu Phe Gly Leu Glu Arg Leu Val Asp Asp Val Ala	
165 170 175	
GAC GTC CGC GGC GCC CGC ACC CGC TTC GTT GCA GTC CAA GCC CAA GCA	576
Asp Val Arg Gly Ala Arg Thr Arg Phe Val Ala Val Gln Ala Gln Ala	
180 185 190	
GCC GTT TCC GAA CCG ACC GGC CAC GAC CGC ACC TCC GTC ATT TTC TCC	624
Ala Val Ser Glu Pro Thr Gly His Asp Arg Thr Ser Val Ile Phe Ser	
195 200 205	
CTA CCG AAT GTG CCA GGC AGC CTC GTG CGC GCC CTC AAC GAA TTC GCC	672
Leu Pro Asn Val Pro Gly Ser Leu Val Arg Ala Leu Asn Glu Phe Ala	
210 215 220	
ATC CGT GGC GTC GAC CTC ACC CGC ATC GAA TCC CGC CCC ACC CGC AAA	720
Ile Arg Gly Val Asp Leu Thr Arg Ile Glu Ser Arg Pro Thr Arg Lys	
225 230 235 240	
GTC TTC GGA ACC TAC CGC TTC CAC CTG GAC ATA TCC GGA CAT ATC CGC	768
Val Phe Gly Thr Tyr Arg Phe His Leu Asp Ile Ser Gly His Ile Arg	
245 250 255	
GAC ATC CCC GTC GCC GAA GCC CTC CGC GCA CTC CAC CTC CAA GCC GAA	816
Asp Ile Pro Val Ala Glu Ala Leu Arg Ala Leu His Leu Gln Ala Glu	
260 265 270	
GAA CTC GTA TTC GTC GGT TCC TGG CCC TCC AAC CGT GCA GAA GAC AGC	864
Glu Leu Val Phe Val Gly Ser Trp Pro Ser Asn Arg Ala Glu Asp Ser	
275 280 285	
ACG CCC CAA ACC GAC CAA CTA GCT AAC GTA CAC AAG GCG GAC GAA TGG	912
Thr Pro Gln Thr Asp Gln Leu Ala Asn Val His Lys Ala Asp Glu Trp	
290 295 300	
GTT CGC GCA GCA AGC GAA GGA AGG AAA CTT AAC TAG	948
Val Arg Ala Ala Ser Glu Gly Arg Lys Leu Asn	

配列番号 : 6 配列の長さ : 948 配列の型 : 核酸 鎖の数 : 二本鎖 トポロジー : 直鎖状	305 310 315	配列の種類 : genomic DNA 起源 生物名 : プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (B revibacteriumlactofermentum) 株名 : AJ12259 (FERM P-3565)
--	---------------------------	--

配列

ATG AGC GAC GCA CCA ATT GTT GTG GCC TAT TTG GGG CCT GCC GGA ACC	48
Met Ser Asp Ala Pro Ile Val Val Ala Tyr Leu Gly Pro Ala Gly Thr	
1 5 10 15	
TTC ACC GAA GAA GCC CTC TAC AAA TTT GCC GAC GCC GGC GTA TTC GGC	96
Phe Thr Glu Glu Ala Leu Tyr Lys Phe Ala Asp Ala Gly Val Phe Gly	
20 25 30	
GAC GGT GAG ATC GAG CAG CTA CCA GCC AAA TCG CCA CAA GAA GCT GTC	144
Asp Gly Glu Ile Glu Gln Leu Pro Ala Lys Ser Pro Gln Glu Ala Val	
35 40 45	
GAC GCG GTC CGC CAC GGC ACC GCC CAG TTC GCG GTG GTC GCC ATC GAA	192
Asp Ala Val Arg His Gly Thr Ala Gln Phe Ala Val Val Ala Ile Glu	
50 55 60	
AAC TTC GTC GAC GGC CCC GTC ACC CCC ACC TTC GAC GCC CTT GAC CAG	240
Asn Phe Val Asp Gly Pro Val Thr Pro Thr Phe Asp Ala Leu Asp Gln	
65 70 75 80	
GGC TCC AAC GTG CAA ATC ATC GCC GAA GAA GAA CTC GAT ATT GGC TTT	288
Gly Ser Asn Val Gln Ile Ile Ala Glu Glu Glu Leu Asp Ile Ala Phe	
85 90 95	
TCC ATC ATG GTC CGG CCA GGG ACT TCG CTT GCC GAC GTC AAA ACC CTC	336
Ser Ile Met Val Arg Pro Gly Thr Ser Leu Ala Asp Val Lys Thr Leu	
100 105 110	
GCC ACC CAC CCG GTT GGG TAC CAA CAA GTG AAA AAC TGG ATG GCA ACC	384
Ala Thr His Pro Val Gly Tyr Gln Gln Val Lys Asn Trp Met Ala Thr	
115 120 125	
ACC ATT CCG GAC GCC ATG TAT CTT TCA GCA AGC TCC AAC GGC GGC GGC	432
Thr Ile Pro Asp Ala Met Tyr Leu Ser Ala Ser Ser Asn Gly Ala Gly	
130 135 140	
GCA CAA ATG GTT GCC GAA GGA ACC GCC GAC GCA GCC GCA GCG CCG TCC	480
Ala Gln Met Val Ala Glu Gly Thr Ala Asp Ala Ala Ala Ala Pro Ser	
145 150 155 160	
CGC GCA GCC GAA CTC TTC GGA CTG GAA CGC CTT GTT GAT GAT GTC GCC	528
Arg Ala Ala Glu Leu Phe Gly Leu Glu Arg Leu Val Asp Asp Val Ala	
165 170 175	
GAC GTC CGC GGC GCC CGC ACC CGC TTC GTT GCA GTC CAA GCC CAA GCA	576
Asp Val Arg Gly Ala Arg Thr Arg Phe Val Ala Val Gln Ala Gln Ala	
180 185 190	
GCC GTT TCC GAA CCG ACC GGC CAC GAC CGC ACC TCC GTC ATT TTC TCC	624
Ala Val Ser Glu Pro Thr Gly His Asp Arg Thr Ser Val Ile Phe Ser	
195 200 205	
CTA CCG AAT GTG CCA GGC AGC CTC GTG CGC GCC CTC AAC GAA TTC GCC	672
Leu Pro Asn Val Pro Gly Ser Leu Val Arg Ala Leu Asn Glu Phe Ala	
210 215 220	
ATC CGT GGC GTC GAC CTC ACC CGC ATC GAA CCC CGC CCC ACC CGC AAA	720

配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
 配列
 GCGGAGCTCG AGAAGTGGTG 20
 配列番号: 16
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
 配列
 ACTCAGAATT CCTTCGAGC 20
 配列番号: 17
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
 配列

GGATTAAAGC TTTGGAGCTT 20
 配列番号: 18
 配列の長さ: 20
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 一本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
 配列
 GTGGATGAAT TCACCACCGA
 20

【図面の簡単な説明】

【図1】 pTS-*aroF*、pTS-*aroG*の構築

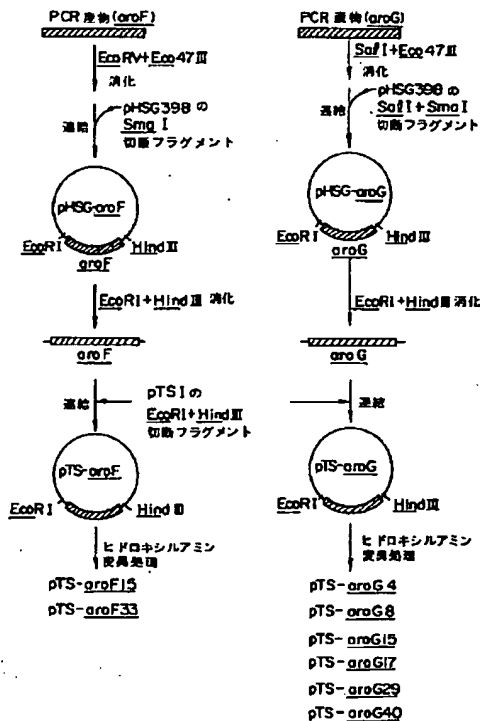
【図2】 天然型及び変異型 *aroF* のDS活性における、L-チロシンによる阻害度を示すものである。

【図3】 天然型及び変異型 *aroG* のDS活性における、L-フェニルアラニンによる阻害度を示すものである。

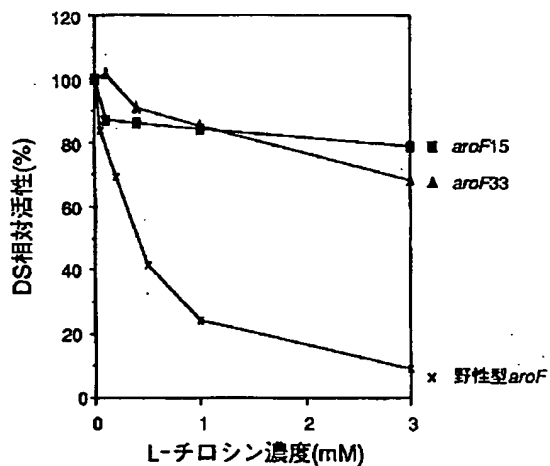
【図4】 野生型および変異型のコリスミン酸ムターゼープレフェン酸デヒドラターゼの、フェニルアラニンによるプレフェン酸デヒドラターゼ活性の阻害を表したものである。

【図5】 pMGA1及びpMGAL1の構築

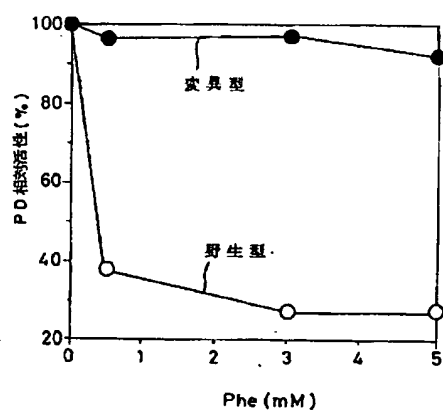
【図1】



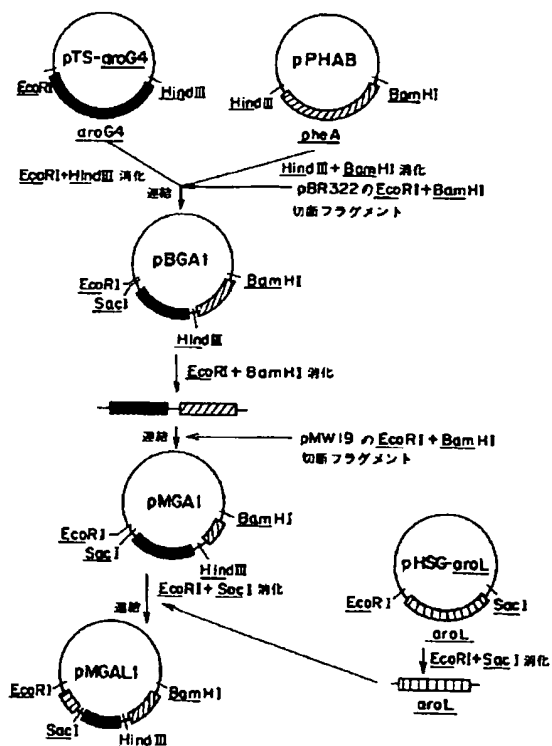
【図2】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 13/22		C 8931-4B		
/(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 P 13/22				
C 1 2 R 1:19)				

(72)発明者 倉橋 修
神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の
素株式会社中央研究所内